

**Zur Beziehung von bestimmten genetisch festgelegten
Merkmalen zu freien Aminosäuren in der Hornschicht
der menschlichen Haut**

Henryk Maister

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0046

Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und
Klimatologie der Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. H. Drexel

Zur Beziehung von bestimmten genetisch festgelegten
Merkmalen zu freien Aminosäuren in der Hornschicht
der menschlichen Haut

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin an der Ludwig Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von

Henryk Maister

aus

Breslau

1977

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Dr. H. Pratzel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Drexel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.4. 1977



ZUR BEZIEHUNG VON BESTIMMTEN GENETISCH FEST-
GELEGTEN MERKMALEN ZU FREIEN AMINOSÄUREN IN
DER HORNSCHICHT DER MENSCHLICHEN HAUT

Henryk Maister

Einleitung und Problemstellung	1
--------------------------------	---

Die Haut

Die Histologie der Haut	5
Die Funktionen der Haut	7
Der Energiestoffwechsel der Haut	8
Die Enzyme der Hautoberfläche	9
Die chemische Zusammensetzung der Haut	11
Die Herkunft der freien Aminosäuren in der Hornhaut	14
Der pH-Wert der Haut	15
Der Aminosäurestoffwechsel	17

Das experimentelle Vorgehen

Auswahl der Versuchspersonen	19
Die Materialgewinnung	21
Die Herstellung des Eluats	22
Die Analyse des Eluats	23
Die Ninhydrinreaktion	27
Der Aufbau des Aminosäurenanalysators	29
Die mathematische Beschreibung der Chromatogrammpeaks	37

Ergebnisse	39
------------	----

Diskussion	53
------------	----

Zusammenfassung	59
-----------------	----

Anhang

Literaturverzeichnis

Einleitung

Schon seit den Anfängen der Medizin ist die Haut des Patienten für den Arzt ein wichtiges Indikatorsystem, das Hinweise auf die Art der Erkrankung gibt. Auch heute noch ist die klinische Begutachtung der Haut ein wichtiges Hilfsmittel, das zur Diagnosefindung wesentlich beiträgt.

Doch nicht nur morphologische Veränderungen – seien sie makroskopisch oder mikroskopisch – des Organs Haut sind von medizinischem Interesse, sondern auch biochemische, pathophysiologische Zusammenhänge in Beziehung zu den verschiedensten Krankheiten müssen betrachtet werden.

Gerade vom Blickwinkel des Biochemikers aus gesehen ist die Haut mit ihren komplizierten Verhornungsprozessen, mit ihrer hohen mitotischen Aktivität ein sehr beachtenswertes Forschungsobjekt, an dem noch viel wissenschaftlich zu erarbeiten ist.

Auch vom Blickwinkel des Genetikers ist die Haut, die ja als leicht zugängliches Organ am einfachsten zu untersuchen ist, ein wesentlicher Indikator, der Indizien für das Vorliegen einer Erbkrankheit liefern kann.

In diesem Zusammenhang ist P.H.C. Newbold (15) zu nennen, der sich mit diesem Problem eingehend beschäftigt hat. Im Folgenden werden einige ausgewählte, genetisch festgelegte Krankheiten vorgestellt, die mit Auffälligkeiten an der Haut einhergehen.

Der Albinismus ist wohl das bekannteste Beispiel hierfür. Bei dieser Krankheit ist das Enzym Tyrosinase mangelhaft ausgebildet, so daß der Aufbau des Hautpigments Melanin aus Tyrosin nicht erfolgt. Dadurch leiden Patienten mit Albinismus an extremer Lichtempfindlichkeit.

Die Phenylketonurie, ein autosomalrezessives Erbleiden, die mehr dafür bekannt ist, daß sie im unbehandelten Zustand zum Schwachsinn führt, kann auch Hauterscheinungen vorweisen. Auch hier besteht oft eine erhöhte Photosensibilität, es können aber auch die verschiedensten Formen von Dermatitis auftreten. Ähnlich wie bei dem Albinismus beruht die Phenylketonurie auf einem Enzymdefekt, und zwar ist der Umbau des Phenylalanins zum Tyrosin gehemmt.

Als weitere Erbkrankheit, die mit Hauterscheinungen einhergeht, ist die autosomal dominante Porphyrria hepatica zu nennen, bei der eine enzymatische Störung des Blutfarbstoffwechsels vorliegt. Hier ist auf die verstärkte Lichtempfindlichkeit mit sekundärer Hyperpigmentierung hinzuweisen.

Die Aufzählung dieser Erbleiden könnte noch durch viele andere Beispiele ergänzt werden, doch ich möchte es bei der Nennung einiger weiterer Krankheitsnamen bewenden lassen. Folgende genetisch fixierte Krankheiten gehen auch mit Hauterscheinungen einher:

Homocystinurie, Hartnup Disease, Ehlers-Danlos Syndrom, Marfan Syndrom.

Für den Internisten – besonders aber auch für den Pädiater – ist die biochemische Analyse des Schweißdrüsen-

kreits der Haut zur Diagnostiksicherung einer bestimmten Krankheit, nämlich der Mukoviszidose, von besonderer Wichtigkeit. Hier ist die Kochsalzkonzentration im vago-mimetisch induzierten Schweiß an der Hautoberfläche des Mukoviszidose-Patienten signifikant erhöht.

Natürlich muß nicht nur bei solchen relativ seltenen Erkrankungen die Haut inspiziert werden, denn auch bei sehr häufigen internistischen Leiden ist diese in Mitleidenschaft gezogen. Man könnte sogar mit Newbold sagen, daß die Haut ein Spiegelbild der internistischen Erkrankung sei, sie biete uns Hinweise an, die wir verwerten oder übersehen könnten.

Am intensivsten beschäftigen sich natürlich die Dermatologen mit der Haut. Von dieser Seite sind auch die interessantesten biochemischen Hautuntersuchungen gemacht worden, die uns wichtige Erkenntnisse über die festen und wasserlöslichen Bestandteile besonders der oberflächlichen Hautschichten gebracht haben.

Hierbei wurden auch – wie bei der vorliegenden Arbeit – die freien Aminosäuren (das sind die Aminosäuren, die als Bestandteile des in Lösung befindlichen Materials der Haut bezeichnet werden können) quantitativ sowie qualitativ analysiert, wenn dies auch mit einer anderen Fragestellung als in meiner Arbeit geschah.

Diesbezüglich seien besonders die Arbeiten von E. Schwarz (24) zu erwähnen, auf die ich noch ausführlich eingehen werde. Gerade die Fragestellung in den Arbeiten von Schwarz unterscheidet sich in typischer Weise von der der vorliegenden Arbeit. Während dieser die Unterschiede in der bioche-

mischen Zusammensetzung der Haut zwischen Hautgesunden und Hautkranken herauszuarbeiten versucht, werden in dieser Arbeit nur gesunde Personen getestet und nach unten beschriebenen Kriterien in Gruppen eingeteilt. Die Gruppen werden dann hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung ihrer Haut – genauer gesagt hinsichtlich der quantitativen als auch qualitativen Zusammensetzung der Haut an freien Aminosäuren – untersucht und miteinander verglichen.

Die vorliegende Arbeit ist somit ein Versuch, in einer gesunden Population Unterschiede in der biochemischen Beschaffenheit der Haut aufzuzeigen und diese Unterschiede zu bestimmten Merkmalen in Beziehung zu setzen.

Die Histologie der Haut

Histologisch wird die Haut in Epidermis (Oberhaut) und Corium (Lederhaut) unterteilt. Von diesen beiden Hautschichten ist die Epidermis am dünnsten. Sie besteht aus einem mehrschichtigen Epithel. An der Oberhaut kann man zwei Hauptschichten unterscheiden, und zwar die Hornschicht und die Keimschicht. Die unterste Zelllage der Keimschicht, das Stratum basale, grenzt an das Corium. Zwischen Stratum basale und Lederhaut befindet sich eine Basalmembran.

Vom Stratum basale geht die Regeneration der Haut aus. Sie liefert den Zellschub für die Epidermis. Von ihr wandern die Epithelzellen an die Hautoberfläche.

Über dem Stratum basale liegt das Stratum spinosum. Die Zellen sind hier durch verhältnismäßig weite Interzellularspalten voneinander getrennt und werden von Desmosomen verbunden.

Das Zytoplasma der Zellen der Keimschicht ist basophil, was man als Zeichen für eine gesteigerte Eiweißsynthese ansehen kann.

Die unterste Schicht der Hornschicht wird Stratum granulosum genannt. In den Zellen dieser Schicht treten Granula auf, die sich stark mit Hämatoxylin anfärben. Über ihre Entstehung und ihre Funktion ist nichts bekannt. In den obersten Zelllagen des Stratum granulosum zerfallen die Zellkerne und lösen sich auf.

Dem Stratum granulosum schließt sich das Stratum lucidum an. In letzterem sind keine Granula mehr vorhanden. Diese

haben sich aufgelöst und in das Eleidin umgewandelt. Eleidin ist eine halbflüssige Substanz und wird mit Eosin rot angefärbt. Sie durchtränkt das ganze Stratum lucidum, so daß die Zellgrenzen kaum mehr erkennbar sind.

Auf das Stratum lucidum folgt die eigentliche Hornschicht, das Stratum corneum. Die Zellen dieser Schicht besitzen keinen Zellkern. In den Zellen sind Zellfilamente nachzuweisen. Es sind die Faserproteine, die wir Keratin nennen.

In der vorliegenden Arbeit wenden wir uns besonders dem Stratum corneum zu.

Die Schichten der Epidermis:

1. Stratum basale
2. Stratum spinosum
3. Stratum granulosum
4. Stratum lucidum
5. Stratum corneum

nach J. Wallraff (34)

Die Funktionen der Haut

Der Haut kann man im wesentlichen 4 Hauptfunktionen zuschreiben:

1. Schutzfunktionen

Als äußere Begrenzung des Körpers schützt die Haut diesen vor Noxen, die von außen auf ihn einwirken, vor allem vor chemischen, mechanischen und thermischen Schäden, besonders auch vor dem Eindringen von pathogenen Keimen in den Organismus. Auf letzteres werden wir noch genauer eingehen.

2. Temperaturregulierung

Die Haut hilft bei der Temperaturregulierung des Körpers auf zweifache Weise. Ein wesentlicher Mechanismus dabei ist die Weit- oder Engstellung der Hautgefäße, womit eine Vergrößerung oder Verkleinerung der Wärmeabgabe des Körpers verknüpft ist.

Ein anderer Mechanismus ist die Schweißsekretion, wobei durch die Verdunstungskälte der Haut Wärme entzogen wird.

3. Wasserhaushaltsregulierung

Die Haut schützt den Körper vor einer Dehydration. Sie steuert durch die Schweißdrüsen die Flüssigkeitsausscheidung.

4. Sinnesorgan

In der Haut liegen Rezeptoren, mit denen Schmerz, Druck und Temperatur wahrgenommen werden können.

Der Energiestoffwechsel der Haut

Bekanntlich ist die Epidermis ein Mäusergewebe, d. h. sie unterliegt immer einem Verschleiß und einer Regeneration ihres Gewebes. Aus der Regenerationsschicht, der Basalschicht, steigen Zellen zur Hautoberfläche auf und unterliegen gewissen Differenzierungsvorgängen.

Es ist anzunehmen, daß dieser Regenerationsvorgang mit einer erheblichen Stoffwechselleistung verbunden ist. Den Energiestoffwechsel hat K. Salfeld untersucht und ist zu einigen interessanten Ergebnissen gekommen (22). Er vergleicht die enzymatische Ausstattung der menschlichen Haut mit der der Rattenleber und der Meerschweinchenhaut und findet in qualitativer Hinsicht keine Unterschiede, dagegen findet er deutliche Unterschiede in der quantitativen Zuordnung der Enzymaktivitäten zueinander.

Nach Salfeld werden in der menschlichen Haut die Stoffwechselleistungen hauptsächlich auf glykolytischen Wege erbracht. In der Rattenleber dagegen sind die Aktivitäten der Enzyme des Zitronensäurezyklus besonders aktiv.

Die enzymatischen Verhältnisse der menschlichen Haut ähneln denen der Meerschweinchenhaut. Doch in der letzteren sind die Enzymaktivitäten des Aminosäuremetabolismus und des Pentosephosphatzyklus relativ höher.

Die Enzyme der Hautoberfläche

Wie man bei der histologischen Betrachtung der Hautoberfläche sieht, fehlen in den oberen Zellagen der Epidermis morphologische Gebilde, die uns als Träger der enzymatischen Aktivität bekannt sind, wie z. B. Mitochondrien.

Aus dieser Beobachtung könnte man vielleicht voreilig schließen, daß in diesen Zellen keine Stoffwechselvorgänge ablaufen würden. Doch läßt man hier die Tatsache außer acht, daß es auch im Zytoplasma frei vorkommende Enzyme gibt.

G. K. Steigleder hat das Vorkommen von verschiedenen Enzymen, wie Phosphatasen, Esterasen, Glucuronidasen, Ribonucleasen und proteolytische Enzyme in der Hautoberfläche nachgewiesen (29). Er hat dabei zwei verschiedene Enzymlager in der oberflächennahen Epidermis mit histochemischen Methoden entdeckt. Zwischen beiden Enzymlagern besteht eine Zwischenzone ohne oder mit geringer histochemisch nachweisbarer Enzymaktivität. Steigleder hat auch herausgefunden, daß in dieser Zwischenzone unter pathologischen Bedingungen, z. B. bei der psoriasisiformen Parakeratose Enzyme aktiv werden. Unter diesen Enzymen werden auch solche nachweisbar, die in der normalen Hornschicht histochemisch nicht aufzufinden sind.

Diese Dreischichtung (oberflächliches Enzymlager, Zwischenzone und unteres Enzymlager) der oberflächennahen Epidermis, die der Hornschicht entspricht, ist auch mit anderen Methoden nachweisbar, wobei die Zwischenschicht Barriere genannt wird.

Nach Steigleder haben die Hautoberflächenenzyme wahrscheinlich verschiedene Herkunft. Nach histochemischen Untersuchungen stammen sie nicht nur von der Epidermis, sondern auch vom Schweiß und von Bakterien ab.

Die Bedeutung der Enzyme der Hornschicht ist bis heute nicht klar. Es könnten natürlich Ausscheidungsprodukte des Organismus sein, die keine Funktion haben und deren sich der Körper entledigen will. Doch die zweischichtige Aufteilung der Enzyme mit der sogenannten Barriere zwischen beiden Schichten läßt vermuten, daß die Enzyme in der Hornschicht doch eine Funktion inne haben, die bisher allerdings noch nicht gründlich erforscht wurde.

Manche Autoren nehmen an, daß besonders proteolytische Enzyme einen Einfluß auf den Verhornungsprozeß der Haut haben. Th. Grüneberg (7) erwähnt besonders ein Enzym der Hornhaut, nämlich die Arginase. Die Arginasetätigkeit wird nach seiner Meinung bei dem Kernzerfall, der im Laufe des Verhornungsprozesses auftritt, zur Entfaltung gebracht.

Bei pathologischen Verhornungsprozessen, wie bei der Psoriasis, bei der in den Verhornungszellen der Zellkern bestehen bleibt, wird demnach keine Arginasetätigkeit freigesetzt.

Inwieweit die Arginase bei der Verhornung eine Rolle spielt oder dabei ohne jede bzw. von geringer Bedeutung ist, steht noch nicht fest.

Die chemische Zusammensetzung der Haut (bzw. der Hornschicht)

In den letzten Jahren wurde die Hornschicht der Epidermis verstärkt biochemischer Untersuchungen unterworfen. In diesen Arbeiten werden die Substanzen, die sich in der Hornschicht befinden, in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich in die in das strukturbildende Keratin fest eingebaute Stoffe und in die wasserlöslichen Substanzen.

Grüneberg (7) gibt dazu folgende Zahlen an: Er fand für das strukturbildende Keratin einen Anteil von 58 %, für die wasserlöslichen Bestandteile einen Anteil von 42 %. Die wasserlöslichen Substanzen enthalten an stickstoffhaltigen Stoffen 38 % Aminosäuren und 62 % andere Bestandteile, die nicht Aminosäuren sind. Letztere Fraktion enthält Purinderivate usw.

E. Schwarz (25) hat die sogenannte Barriere und die Oberflächenschicht des Stratum Corneum getrennt untersucht. Er findet bei der Barriere 50 % Skleroproteine, 38 % wasserlösliche Substanzen, 2 % Lipide, 10 % Wasser.

Für die Oberflächenschicht gibt er an: 50 % Skleroproteine, 23 % wasserlösliche Substanzen, 20 % Lipide, 7 % Wasser.

Mit 10 % (7%) Wassergehalt wäre die Hornschicht zu den wasserärmsten Geweben des menschlichen Körpers zu rechnen. Den unterschiedlichen Gehalt an Lipiden zwischen Oberflächenschicht und Barriere führt Schwarz auf die größere Kontamination mit Talg der ersteren zurück. Außer Skleroproteinen liegen nach seiner Meinung keine anderen großmolekulare Stoffe in nennenswerten Mengen vor. Lösliche Proteine müßten also bei der einsetzenden Verhornung entweder

in Skleroproteine umgewandelt oder hydrolysiert worden sein. Im letzteren Fall würde man sie in Form von Peptiden oder freien Aminosäuren als Bestandteil des Wasserlöslichen finden.

H. W. Spier (30) hat insbesondere die wasserlöslichen Bestandteile der Hornschicht zu identifizieren versucht. 90 % der wasserlöslichen Substanzen konnte er identifizieren: Etwa 40 % sind freie Aminosäuren, 10 % Milchsäure, 9 % Pyroglutaminsäure, 5 % Natrium, 5 % Harnstoff, 4 % Kalium, 4 % Chlorid, 2 % Urocaninsäure.

In Psoriasissschuppen hat Schwarz (26) den Gehalt an stickstoffhaltigen, wasserlöslichen Verbindungen erheblich vermindert gefunden. Die Ursache dafür sieht Schwarz darin, daß bei der psoriatischen Verhornung weniger großmolekulares Material in wasserlösliche Bestandteile zerlegt wird.

Besonders auch die freien Aminosäuren sind in den Psoriasissschuppen vermindert. Nicht nur quantitative Unterschiede im Vergleich zu gesunder Haut sind hier aufzufinden, sondern auch qualitative Differenzen in der Aminosäurezusammensetzung. Die auffälligsten Unterschiede bieten die Aminosäuren Serin, Citrullin und Glycin.

Bei dem Vergleich der chemischen Substanzen in der Hornschicht unbefallener Haut von mikrobiellen Ekzematikern mit denen in der Hornschicht von Hautgesunden fand Schwarz auch einen Unterschied in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren.

Es ergaben sich hier besonders Differenzen für die Aminosäuren Histidin, Glutaminsäure, allo-Isoleucin und Tryptophan. Altersveränderungen im Gehalt an Aminosäuren zeigt Schwarz (28) in einer anderen Arbeit auf. Signifikante Un-

terschiede in der Verteilung der freien Aminosäuren in Abhängigkeit vom Alter in der oberflächlichen Hornschicht sieht er vor allem bei Glycin, Alanin, Valin, Threonin, Glutaminsäure, Histidin, Citrullin. Auch im Harnstoff- und Milchsäuregehalt sieht Schwarz signifikante Unterschiede, deren Minderung in der Altershaut er auf eine reduzierte Schweißbildung zurückführt.

Den Gesamtgehalt der Hornschicht an freien Aminosäuren gibt Schwarz mit 550–1300 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht an. Das ist deutlich erhöht gegenüber dem Gehalt an freien Aminosäuren in der menschlichen Gesamtepidermis, der in einem Bereich zwischen 200 und 440 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht liegt.

Es liegen auch Untersuchungen der freien Aminosäuren der Tierhaut vor. Als Beispiel ist die Arbeit von J. Tabachnick (32) zu nennen. Er hat die Haut von Meerschweinchen (albino guinea pig) untersucht. Er fand an freien Aminosäuren 25,1 % Serin und 15,6 % Glycin. Der Anteil dieser beiden Aminosäuren am Gesamtgehalt an freien Aminosäuren wird also mit etwa 40 % veranschlagt. Weitere 30 % teilen sich unter den Aminosäuren Citrullin, Alanin und Prolin etwa zu gleichen Anteilen auf.

Cystein konnte auf der Meerschweinchenhaut nicht gefunden werden. Die Konzentration der Aminosäuren in der Haut der Meerschweinchen ist nach Tabachnick 200-fach höher als im Plasma.

Die Herkunft der freien Aminosäuren in der Hornhaut

S. Rothman (20) sieht für die wasserlöslichen Bestandteile der Hornschicht den Schweiß als Quelle.

Für Schwarz (28) sind etwa 30 % des Wasserlöslichen in der Hautoberfläche Schweißrückstände, der Großteil aber Überbleibsel der epidermalen Keratinisation. So gestatten diese Keratinisationsrückstände und damit die freien Aminosäuren gewisse Rückschlüsse auf die Verhornungsvorgänge und deren Störungen.

Th. Grüneberg (7) vertritt auch die Meinung, daß die wasserlöslichen Bestandteile größtenteils Substanzen sind, die bei den Verhornungsprozessen der Haut entstehen. Diese Annahme ist durch den Befund bestärkt, den Grüneberg bei dem Vergleich der wasserlöslichen Substanzen in normaler Haut und psoriatischer Haut erhebt.

In der psoriatischen Schuppe sind die wasserlöslichen Extraktstoffe wesentlich geringer als in der normalen Haut. In der psoriatischen Hornschicht – im Gegensatz zur normalen Haut – sind als wesentlicher Unterschied Zellkerne vorhanden. Dies macht die Annahme plausibel, daß ein Großteil der wasserlöslichen Bestandteile bei der normalen Verhornung aus den zerfallenden Zellkernen stammen und daß bei der Psoriasis infolge des Persistierens der meisten Zellkerne und der damit verbundenen veränderten Verhornungsvorgänge die Verminderung des Wasserlöslichen entsteht.

Nach Grünebergs Meinung ist es sogar der Hauptunterschied zwischen normaler und psoriatischer Zelle, daß letztere unfähig ist, in ausreichendem Maße wasserlösliche Substanzen zu bilden.

Der pH-Wert der Haut

A. Marchionini (13) hat schon 1929 pH-Wertmessungen an der Hautoberfläche durchgeführt. Er fand damals den für ihn überraschend hohen Säuregrad der Haut von pH 3,0 – 5,0.

Marchionini glaubte in den freien Aminosäuren des Stratum Corneum Substanzen zu sehen, die wesentlich für den niedrigen pH-Wert der Haut und deren Pufferkapazität verantwortlich sind.

Pathogene Keime, die an die Haut gelangen, werden normalerweise nicht von sauren, sondern von alkalischen Milieu begünstigt (Keining, Braun-Falco, 11) . So kann man annehmen, daß der relativ saure pH-Wert der Haut die Funktion der Bakterienabwehr hat.

A. Szakall (31) hat die Hautoberfläche schichtenweise untersucht und ist zu dem Ergebnis gekommen, daß der pH-Wert im Stratum corneum, von der Hautoberfläche nach innen vorgehend, bis zum Stratum lucidum saurer wird; zahlenmäßig handelt es sich um eine Abnahme des pH-Wertes von 6,4 auf 4,5. Danach nimmt der pH-Wert in den tieferen Schichten wieder zu. Er erreicht in der Tiefe des Stratum germinativum allmählich die pH-Werte des Blutes.

Auch Szakall ist der Ansicht, daß der Säuremantel der Haut – dieser Begriff stammt von Marchionini – wesentlich zur Abwehr pathogener Keime beiträgt.

Die Bacterizidie ist nach Szakall die passive Folge dreier funktioneller Vorgänge:

1. Talgabsonderung
2. Schweißabsonderung
3. Keratinisierungsprozesse

Die Beständigkeit, mit welcher sich der pH-Wert konstant erhält, wird verschiedenen Puffersystemen zugeschrieben. Diese sind vor allem das Laktatsystem, die sauren und die basischen Gruppen der Eiweißkörper und die freien Aminosäuren.

Ähnliche Vorstellungen über den pH-Wert der Haut und seine Funktion entwickelten O. Jakobi (9), I. H. Blank (2), W. Burckhardt (4), R. Erbrecht (6) und W. Schneider (23).

Der Aminosäurestoffwechsel

Die Aminosäuren, die bekanntlich die Grundbausteine der Proteine darstellen, kann man in folgende vier Gruppen einteilen:

- Aminosäuren mit unpolarem Rest
dazu gehören Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin und Phenylalanin;
- Aminosäuren mit polar wirkenden Gruppen
dazu gehören Tyrosin, Tryptophan, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Cystin, Asparagin und Glutamin;
- Aminosäuren mit sauren Gruppen
dazu gehören Glutaminsäure und Asparaginsäure;
- Aminosäuren mit basischen Gruppen
dazu gehören Lysin, Arginin und Histidin;

Die Mehrzahl dieser Aminosäuren können im menschlichen Organismus synthetisiert werden, doch einige müssen dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden. Letztere werden essentielle Aminosäuren genannt. Dies sind: Valin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Threonin, Phenylalanin und Tryptophan.

Viele der Aminosäuren unterliegen einem komplizierten Ab- und Umbau. Dazu seien hier die wichtigsten dieser Vorgänge herausgegriffen.

Verschiedene Aminosäuren werden decarboxiliert und es entstehen dabei die sogenannten biogenen Amine. Aus Glutaminsäure wird z.B. Gamma-Aminobuttersäure, die als Transmittersubstanz an den Ganglien ihre Bedeutung hat und aus Histidin wird Histamin.

Viele Aminosäuren können transaminiert werden, und es entstehen dabei alpha-Ketocarbonsäuren. Zum Beispiel entsteht aus Glutamat alpha-Ketoglutarinsäure.

Manche Aminosäuren stehen mit dem Harnstoffzyklus in Beziehung. In diesem wird – vereinfacht gesagt – aus Ammoniak, Kohlendioxid und Energie Harnstoff gebildet. Die Funktion dieses Reaktionsablaufes ist die Entfernung des giftigen Ammoniaks in Form von Harnstoff aus dem Organismus. Die Aminosäuren Asparaginsäure, Arginin, Ornithin sind wesentlich am Harnstoffzyklus beteiligt.

Aus den Aminosäuren Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin entsteht in einem komplizierten Abbau aktivierte Essigsäure. Diese spielt bei dem Aufbau von Fettsäuren eine wesentliche Rolle. Der Stoffwechsel von Phenylalanin und Tyrosin ist besonders interessant, da aus diesen beiden Aminosäuren das Hautpigment Melanin und die Hormone Adrenalin und Tyroxin synthetisiert werden.

Von wesentlicher Bedeutung ist auch noch der Stoffwechsel der Aminosäure Ornithin, da aus ihr das Hydroxyprolin gebildet wird, welches ein Baustein des Kollagens ist.
(nach Karlson 10)

Auswahl der Versuchspersonen

Wie schon anfangs erwähnt, haben wir in dieser Arbeit nur gesunde Versuchspersonen getestet, da wir nicht den Unterschied zwischen Gesunden und Kranken (insbesondere Hautkranken) in der Aminosäurezusammensetzung – genauer gesagt in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren – des Stratum corneum feststellen wollten, sondern herausfinden wollten, von welchen Faktoren die große Schwankungsbreite der Konzentrationen der freien Aminosäuren, wie sie von vielen Autoren beschrieben wurde, beim Vergleich gesunder bzw. hautgesunder Individuen abhängt.

Schwarz (28) hat schon in einer Arbeit gezeigt, daß die Zusammensetzung der freien Aminosäuren eine Altersabhängigkeit aufweist. Darum wurde für die vorliegende Arbeit beschlossen, Personen nur einer bestimmten Altersgruppe als Testpersonen zu verwenden. Die Versuchspersonen waren im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Damit wurde versucht, den Faktor Alter, der nach Schwarz die Konzentrationen der freien Aminosäuren beeinflußt, auszuklammern.

Personen, die Medikamente einnahmen, wurden ebenfalls von der Untersuchung ausgeschlossen. Eine Ausnahme wurde bei Antikonzeptiva gemacht. Diese wurden von fast allen weiblichen Testpersonen eingenommen.

Es wurden weibliche und männliche Versuchspersonen getestet, und zwar genau zur Hälfte. Es sollte versucht werden, mögliche geschlechtsabhängige Unterschiede in den Konzentrationen der freien Aminosäuren zu finden.

Des weiteren wurden die Versuchspersonen hinsichtlich ihrer Augenfarbe ausgesucht. Dies geschah, um Ergebnisse von W.

Müller (14) zu überprüfen, der Beziehungen zwischen Augenfarbe und Aminosäurenkonzentrationen in der Hornhaut der menschlichen Haut in seiner Arbeit angedeutet hat. Dies scheint vielleicht auf den ersten Blick ein nicht mitelbar verständlicher oder einsehbarer Zusammenhang zu sein. Doch muß man sich hier vor Augen führen, daß eine Anzahl von verschiedenen Krankheitsbildern bekannt ist, die mit einer Störung im Aminosäurestoffwechsel und mit einem gehäuften Auftreten einer bestimmten Augenfarbe und Haarfarbe einhergeht.

P. Newbold (15) beschreibt z. B. Fälle von Phenylketonurien in Japan, die dadurch besonders auffallen, daß die an diesem Erbleiden Erkrankten hellere Haut-, Haar- und Augenfarbe als ihre Landsleute und ihre Verwandtschaft haben. Bei uns ist für die Phenylketonurie helle Haut, blondes Haar und blaue Augen typisch.

Für die vorliegende Arbeit wurden Testpersonen ausgewählt, deren Augenfarbe eindeutig als grün, braun oder blau angegeben werden konnte,

Bezüglich der Haarfarbe haben wir die Versuchspersonen in hell- und in dunkelfarbig eingeteilt.

Die Materialgewinnung

Um Zellagen aus dem Stratum corneum der Epidermis zu gewinnen, wurde die Abrißmethode verwandt, die in der amerikanischen Literatur "strip method" genannt wird. Diese Methode wurde 1937 von Wolf eingeführt und von Szakall und Pinkus weiterentwickelt. Es hat sich gezeigt, daß diese Methode sowohl für anatomische als auch für physiologische biochemische Hautuntersuchungen gut geeignet ist, wie besonders Szakall (31) gezeigt hat. Mit dieser Methode ist es möglich, ohne großen Aufwand an der Haut eines lebenden Individuums einzelne Schichten abzutragen, um diese getrennt untersuchen zu können.

Als Hautareal, an dem wir die Hautabrisse vornahmen, wurde die ulnare Seite der Unterarminnenfläche gewählt, da dieser Hautbezirk relativ frei von Haaren ist.

Hier werden im Abstand von 15 cm zwei Markierungsstriche angebracht. Über diese Markierungen wird ein etwa 20 cm langer und 1,2 cm breiter Klebestreifen gelegt (Tesafilm WZ, Fa. Beiersdorf) und auf der Haut glattgestrichen. Dann wird der Tesafilmstreifen vorsichtig mit der daran haftenbleibenden Hautschicht abgezogen. Auf dem Klebestreifen haben sich die Markierungsstriche übertragen; an diesen wird der Tesafilm auf die Länge von 15 cm verkürzt. Die abgeschnittenen Enden werden verworfen.

Insgesamt werden bei jeder Testperson 8 solcher Abrißproben angefertigt, und zwar werden die Streifen immer an der gleichen Hautstelle aufgelegt und abgezogen. Mit dem 8. Abriß ist man etwa an die Barriere angelangt.

Die Testfilmstreifen werden bis zur Weiterverarbeitung in Reagenzgläsern - luftdicht verschlossen - bei Kühlschranktemperatur aufgehoben.

Die Herstellung des Eluats

Zur Weiterverarbeitung werden die Klebestreifen in etwa 1 cm^2 große Stückchen zerschnitten und in einen Behälter gegeben, der 5 ml 0,1 n HCl enthält (die Schnipsel der 8 Klebestreifen von einer Person kommen in einen einzigen Behälter).

Die Behälter werden luftdicht verschlossen, und man läßt die Salzsäure 7 Tage auf die Tesafilmschnipsel mit den daran hängenden Hautproben bei Kühlschranktemperatur einwirken.

Dann werden die Klebestreifen aus der verdünnten Salzsäure entfernt und verworfen. In den Behältern bleibt das Eluat zurück. In dem Eluat befinden sich die herauslösbaren wasserlöslichen Bestandteile der Hornschicht. Die festen Bestandteile des Stratum corneum bleiben unberührt.

Bis zur Weiterverwendung wird das Eluat eingefroren.

Die Analyse des Eluats

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Auftrennung der freien Aminosäuren in dem Hornhauteluat. In dem Eluat befinden sich auch andere organische Substanzen. Diese wurden hier nicht berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Aminosäuren wurde ein automatischer Aminosäurenanalysator (CHR 2, Fa Labotron) benutzt.

Das Prinzip des angewandten Verfahrens zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung ist die Ionenaustauschromatographie. Ionenaustauscher sind Kunstharze mit sauren oder basischen Gruppen. Bei unserem Verfahren wurde ein Kationenaustauscher verwandt (Polystyrolsulfonat). Dieser besitzt saure Gruppen, die Protonen abdissoziieren können und gegen andere positive Ionen zu tauschen in der Lage sind.

Dieser chemische Mechanismus ist das Prinzip der Ionenaustauschromatographie. Hier wird das Kunstharz in einem Glasrohr zur Säule geschichtet. Man läßt in die obere Öffnung des Rohres die zu analysierende Flüssigkeit einsickern – in unserem Falle die Aminosäuren im Eluat gelöst – und wäscht mit einer Pufferlösung nach, die in der Säule einen konstanten pH-Wert garantiert.

Die Aminosäuren werden mit ihrer NH_4^+ -Gruppe zunächst an der Säuregruppe des Harzes festgehalten, aber dann wieder freigegeben und gegen Lithium- oder Natrium-Ionen des Puffers eingetauscht. Die Bindung der Aminosäuren an die Säuregruppen des Harzes, die Wiederablösung und der Austausch gegen Lithium- oder Natrium-Ionen wiederholt sich von Schicht zu Schicht bis schließlich die Aminosäuren am Ende der Säule in der abtropfenden Flüssigkeit austreten.

Dabei verlassen die einzelnen Aminosäuren nach verschiedener Verweilzeit die Säule, d. h. sie verlassen zeitlich getrennt den Ionenaustauscher.

Wie stark eine Aminosäure an die chemisch aktiven Gruppen des Ionenaustauschers gebunden wird und wie lange sie damit in der Ionenaustauschersäule verweilt, hängt von ihrem Ionisationszustand ab. Dieser wird im wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt:

1. von der Dissoziationskonstanten der sauren und basischen Gruppen der Aminosäure
2. von dem pH-Wert des als Elutionsmittel verwandten Puffers.

Es wird also bei der Ionenaustauschchromatographie der Aminosäuren die unterschiedliche Dissoziation der Aminosäurenguppen – die Dissoziationszustände der Amino- und Carboxylgruppen – unter Einfluß eines optimalen pH-Wertes ausgenutzt.

Die Reihenfolge, mit der die Aminosäuren die Säule verlassen, ist bei den verschiedensten Apparaturen ähnlich, so daß eine Aminosäure durch ihren Platz in dieser Reihe identifiziert werden kann. Die Güte der Auftrennung hängt von verschiedenen Faktoren ab:

1. von der Länge der Säule
2. von dem Ionenaustauschharz
 - a) von der chemischen Beschaffenheit des Harzes
 - b) von der Partikelgröße des Harzes
3. von den Puffern
 - a) von der Durchflußmenge der Puffer
 - b) von den pH-Werten der Puffer
4. von der Temperatur der Ionenaustauschersäule

Alle diese Faktoren können variiert werden, um das Analyseergebnis zu optimieren. Dabei sind natürlich gewisse Grenzen gesetzt. So wird z. B. bei der Verlängerung der Ionenaustauschersäule die Analysenzeit dementsprechend verlängert oder eine pH-Wertveränderung des Puffers kann die Auftrennung von bestimmten Aminosäuren verbessern, doch die Auftrennung anderer wiederum verschlechtern. Deshalb wird man in der Variation dieser vier Faktoren Kompromisse eingehen müssen.

In dieser Arbeit wurden durch die Verwendung von verschiedenen Puffern mit drei verschiedenen pH-Werten, einer Beheizung der Trennsäule und einer relativ kurzen Säule gute Ergebnisse erzielt. Wir erhielten zwar keine überall vollständige Auftrennung der Aminosäuren, konnten aber die Auftrennung mit Hilfe eines Computerprogrammes rechnerisch vervollständigen.

In dem verwandten automatischen Aminosäurenanalysator war die Ionenaustauschersäule 33 cm lang und 0,45 cm stark. Als Austauschharz nahmen wir Polystyrolsulfonat (8 % quervernetztes, sulfuriertes Polystyrolharz mit einem Durchmesser von 8 μ).

Es wurden 3 Lithiumpuffer verwendet (P_1 , P_2 , P_3). P_1 hatte einen pH-Wert von 2,80, P_2 hatte einen pH-Wert von 3,69 und P_3 einen pH-Wert von 4,10. Während der Analyse wechselte die Temperatur von 35° auf 60°C.

Die Puffer wurden unter Druck in das Analysensystem gepumpt, dabei durfte aus technischen Gründen der Druck nicht 45 atü überschreiten.

Nach jedem Analysendurchlauf wurde das System regeneriert, d. h. mit Lithiumlauge gespült und dann wieder mit Puffer äquilibriert.

Die Analysenzeit mit Regeneration und Äquilibration betrug 8 Stunden.

Pufferrezepte

Puffer	P ₁	P ₂	P ₃
pH	2,80	3,69	4,10
normal Citrat	0,2	0,2	0,2
normal Lithium	0,3	0,8	1,2
LiOH 98 %	2,44	14,66	24,42
tri-Li-citrat 4H ₂ O	18,80	18,80	18,80
Thiodiglykol	5 ml	5 ml	-
HCL 32 %	21 ml	70 ml	100 ml
Pentachlorphenol	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Brij ^{x)}	2 ml	2 ml	2 ml
bidestilliertes Wasser ad 1 Liter Puffer			

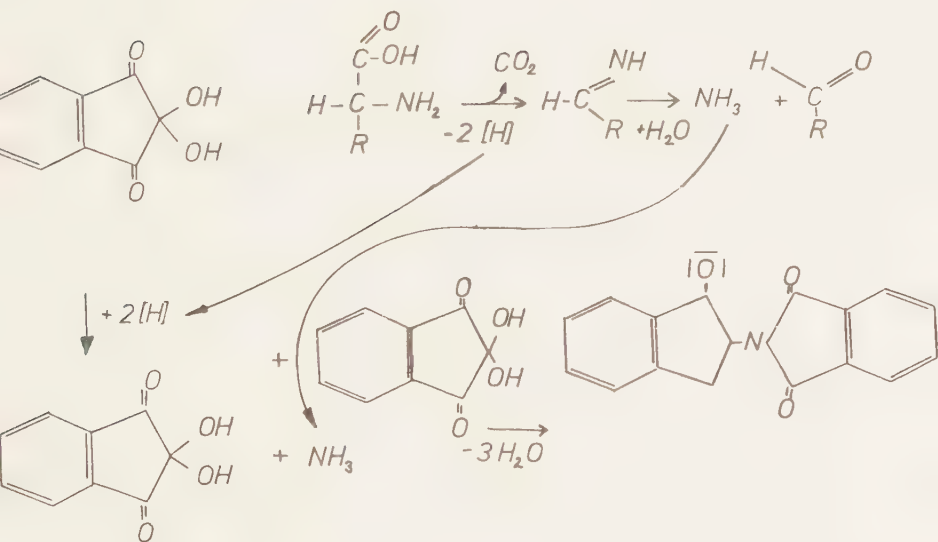
^{x)} Brij 35-Lösung: 175 g Polyoxyäthylenlauryläther werden unter Erwärmen in 525 ml bidestilliertes Wasser unter Rühren gelöst.

Die Ninhydrinreaktion

Nach der Auftrennung in der Analysensäule müssen die Aminosäuren angefärbt, d.h. kolorimetrisch erfaßbar gemacht werden. Es wird hier die Ninhydrinreaktion angewandt.

Die Aminosäure wird zum nächstniedrigeren Aldehyd und CO_2 abgebaut. Dabei wird Ammoniak frei. Das Ninhydrin bildet mit dem Ammoniak einen blauen Farbkomplex.

Abbildung 1 - Die Ninhydrinreaktion (10)



Herstellung des Ninhydrinreagens

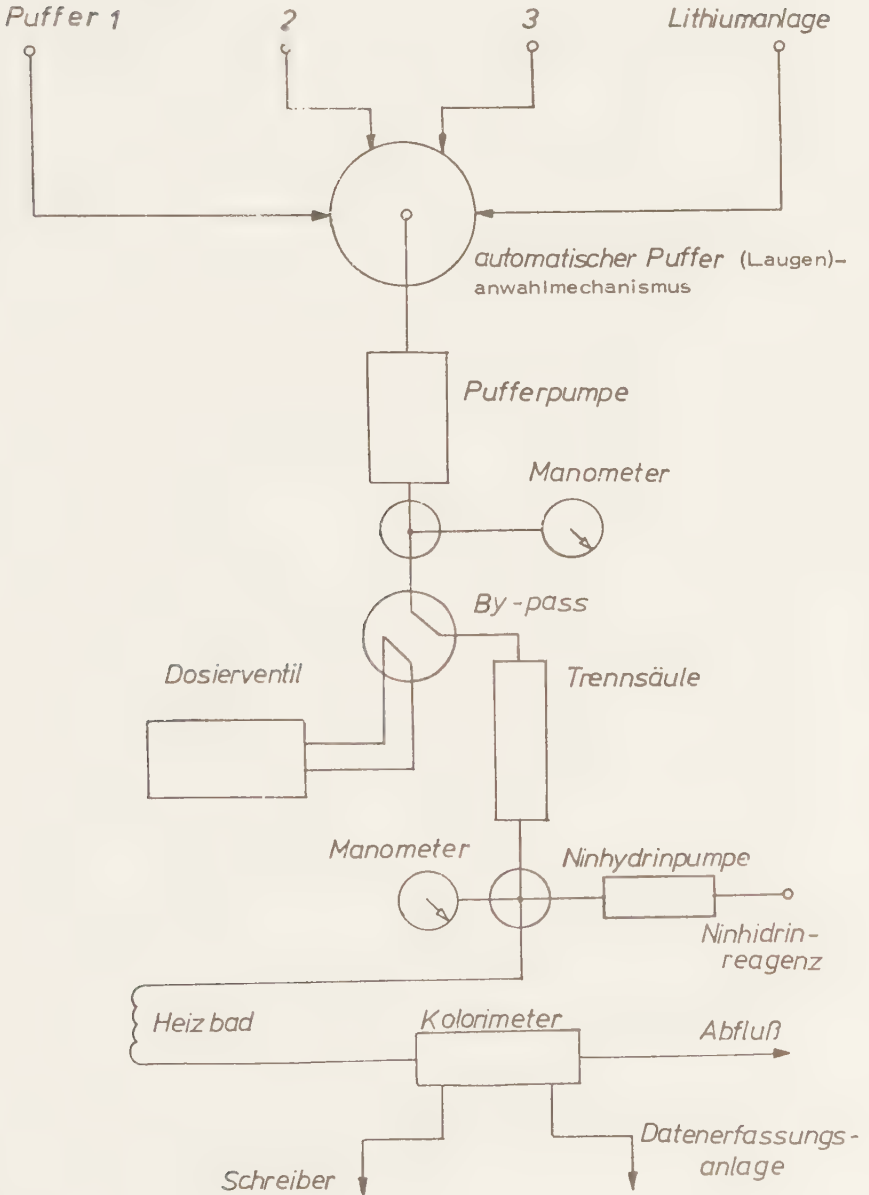
Die Herstellung des Ninhydrinreagens muß unter Luftabschluß erfolgen.

Reagenzien:	Ninhydrinpulver	40 g
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	1500 ml
	Hydrindantinpulver	1,374 g
	4-molarer Lithiumacetatpuffer	500 ml

Da das Ninhydrinreagens sehr sauerstoff- und lichtempfindlich ist, muß es immer wieder frisch hergestellt werden und darf nicht lange aufbewahrt werden.

Der Aufbau des Aminosäurenanalysators

Abbildung 2 - Schema des Aminosäurenanalysators



Die einzelnen Elemente des Aminosäurenanalysators

Man kann am Aminosäurenanalysator 8 verschiedene Bauelemente unterscheiden:

1. Die Säuleneinheit
2. Das Dosiergerät
3. Die Pumpen
4. Die Heizeinheit
5. Die Reagenzeinheit
6. Die Meßeinheit
7. Die Datenerfassung
8. Die automatische Steuerung

1. Die Säuleneinheit

Die Trennsäule ist schon weitgehend beschrieben worden. Es handelt sich um eine 33 cm lange und 0,45 cm starke (Durchmesser) Glasröhre. Sie ist mit Polystyrolharz gefüllt. Die Trennsäule ist vom Wassermantel umgeben, mit dem man die Säule auf die gewünschte Temperatur bringen kann. Der Wassermantel wird durch einen kontinuierlich fließenden Wasserstrom gebildet, der durch die Heizeinheit erwärmt werden kann.

2. Das Dosiergerät

In das Dosiergerät können gleichzeitig 6 Proben eingegeben werden. Von jeder Probe benötigen wir etwa 200 μl . Das Dosiergerätsystem kann mit Hilfe eines Bypasses in

das Analysensystem ein- oder ausgeschaltet werden. Die Auswahl der Proben und die Ein- und Ausschaltung der Dosiereinheit geschieht automatisch durch die Steuereinheit.

3. Die Pumpen

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, hat der Aminosäurenanalysator zwei Pumpen, nämlich eine für die drei Puffer und die Lauge, die andere für das Ninhydrinreagens. Mit Hilfe der Pumpen werden diese Reagenzien unter Druck in das Analysensystem eingeschleust.

Bei den Pumpen handelt es sich um Kolbenpumpen mit Kugelventilen, die mit Elektromotoren betrieben werden. Sie besitzen eine Vorrichtung zur Entgasung der Puffer.

Der Druck, der durch die Pumpen erzeugt wird, kann an Manometern abgelesen werden. Er darf aus technischen Gründen einen Maximalwert (45 atü) nicht übersteigen, da dies die Apparatur überfordern würde. Ein allzu starkes Ansteigen oder Abfallen des Druckes weist übrigens auf einen technischen Defekt hin.

4. Die Heizeinheit

Die Heizeinheit wird über einen Thermostaten automatisch gesteuert. Von hier aus kann die Trennsäule durch einen Wassermantel, der durch einen kontinuierlichen, konstant temperierten Wasserstrom erwärmt wird, auf die gewünschte Temperatur gebracht werden. Außerdem führt ein Heizschlauch die Analysesubstanzen, nachdem Ninhydrin zugeführt ist, durch ein Heizbad, das durch einen Thermostaten

auf einer gewünschten Temperatur gehalten wird. Die Länge des Heizschlauches bestimmt die Verweildauer der Analysesubstanzen und des mit ihnen reagierenden Ninhydrin im Heizbad.

5. Die Reagenzeinheit

Die drei vorher beschriebenen Puffer und die Lithiumlauge sind in Vorratsflaschen gefüllt. Die Flaschen sind durch Schlauchleitungen mit einem Umschaltventil verbunden. Hier befindet sich ein automatischer Anwahlmechanismus, der programmgemäß die gewünschte Reagens durch eine Schlauchleitung der Pumpe zuführt.

Der Ninhydrinflasche ist eine Pyrogallolfalle vorgeschaltet. Dieser Pyrogallolaufsatz soll verhindern, daß das Ninhydrinreagens mit Luftsauerstoff in Berührung kommt; denn das Ninhydrin wird sehr leicht durch Sauerstoff oxidiert.

Das Pyrogallol fängt den Sauerstoff ab und verhindert damit, daß das Ninhydrinreagens vorschnell unbrauchbar wird. Eine zweite Maßnahme zur Verhinderung des Eindringens von Sauerstoff ist die Überdruckbegasung mit reinem Stickstoff. Das Ninhydrinreagens steht unter einer Stickstofftauchung von 25 cm H_2O . Damit ist dafür gesorgt, daß etwaige kleine Mengen an Sauerstoff, die an undichten Stellen trotz aller Vorichtsmaßnahmen eingedrungen sind, verdrängt werden.

6. Die Meßeinheit

Wie schon beschrieben wurde, werden die Aminosäuren nach der Auftrennung in der Säule mit dem Ninhydrinreagens angefärbt und es entsteht ein Farbkomplex. Die Farbintensität wird

mit einem Kolorimeter gemessen. Diese ist ein Maß für die Konzentration der mit dem Ninhydrinreagens reagierenden Aminosäuren.

In dem hier verwandten Kolorimeter befanden sich PVC-Küvetten mit einer Schichtdicke von 2 und 5 mm und einer Bohrung von 1,5 mm mit Glasfenstern. Die Wellenlängen, bei denen gemessen wird, betragen 570 nm (Küvettschichtdicke 2 mm) und 440 nm (Küvettschichtdicke 5 mm).

7. Die Datenerfassung

Die vom Kolorimeter gemessenen Veränderungen des Lichtdurchganges, die durch die Schwankungen der Farbkonzentrationen entstehen und ein Maß für die augenblickliche Konzentration der jeweiligen Aminosäure sind, werden von einem Schreiber kontinuierlich registriert und auf einer Papierrolle mit Extinktionsmaßstab aufgezeichnet. Diese graphische Darstellung dient zur Dokumentation und zur Kontrolle. An ihr sind technische Mängel am anschaulichsten festzustellen, doch zur rechnerischen Auswertung eignet sie sich weniger, da diese mit geometrischen Methoden nur ungenau werden würde.

Deshalb werden die Extinktionswerte des Kolorimeters zur weiteren rechnerischen Verarbeitung in einer Datenerfassungsanlage gespeichert. Dazu müssen die Analogsignale des Kolorimeters erst in das Digitalsystem übertragen werden. Es werden die zwei Kolorimeterkanäle (gemessen wird bei den zwei Wellenlängen 570 nm und 440 nm) mit einem Multiplexer in einem 10-Sekunden-Rhythmus abgetastet. Dann werden die hier registrierten Werte einem AD-Wandler zugeführt und im ASCII-Code auf einem Fernschreiber übertragen (Fernschrei-

ber Teletype ASR33). Der Fernschreiber überträgt die Werte auf einen Lochstreifen und auf eine Papierrolle werden sie zur Kontrolle auch noch ausgedruckt.

8. Die automatische Steuerung

Die bisher beschriebenen Elemente des Aminosäurenanalysators werden von der Steuereinheit automatisch gelenkt. Diese Steuerungsautomatik sorgt für eine wesentliche Arbeitserleichterung und für ein präzises Ablaufen des Analysenprogrammes, wie es ohne Automatik wohl nicht durchführbar wäre.

Die Wartung des automatischen Aminosäurenanalysators besteht im wesentlichen im folgenden:

1. Jeden zweiten Tag müssen neue Proben in das Dosiergerät gefüllt werden. Die Analysenzeit für eine Probe beträgt 8 Stunden; in unser Dosiergerät können wir 6 Proben einfüllen, so daß nach 48 Stunden dieses erneut gefüllt werden muß.
2. Die Lochstreifen des Fernschreibers müssen täglich gewechselt werden. Wir können auf eine Lochstreifenrolle die Werte von 3 Chromatographien unterbringen.
3. Die Papierrollen des Chromatogrammschreibers und des Fernschreibers müssen nicht so häufig erneuert werden, sie reichen mehrere Tage.
4. Die Auffüllung der Reagenzienvorratsflaschen geschieht für die verschiedenen Reagenzien nach unterschiedlicher Zeit, da diese verschieden schnell aufgebraucht werden.
5. Es müssen technische Mängel gefunden und beseitigt werden. Diese werden vor allem durch die Manometer und durch Direktaufzeichnung der Chromatogramme mit Hilfe

des Schreibers angezeigt.

Ein starker Druckabfall – angezeigt durch die Manometer – könnte auf den Ausfall der Pumpen oder auf eine undichte Stelle in den Leitungssystemen hinweisen; ein starker Druckanstieg könnte ein Zeichen für eine Verstopfung im Leitungssystem sein.

Die Mängelfeststellung anhand der graphischen Aufzeichnungen des Schreibers sind im wesentlichen aus der Erfahrung erlernbar und die Auffindung der Fehlerquelle gestaltet sich häufig als nicht sehr einfach.

Im ganzen gesehen verlief unser Versuchsablauf nicht immer störungsfrei, so daß wir viele Proben einmal oder auch sogar mehrmals wiederholen mußten. Der Aminosäurenanalysator wurde für diese Arbeit – wenn man auch die Zeit für die Testgemische mitrechnet, die regelmäßig mit den Proben zur Kontrolle mitliefen – 1152 Stunden in Anspruch genommen.

Im einzelnen sieht dies folgendermaßen aus:

52 x 8 Stunden für Testgemische;

92 x 8 Stunden für Proben inklusive deren Wiederholungen
bei Mängeln;

144 x 8 Stunden = 1152 Stunden insgesamt.

Die Datenverarbeitung

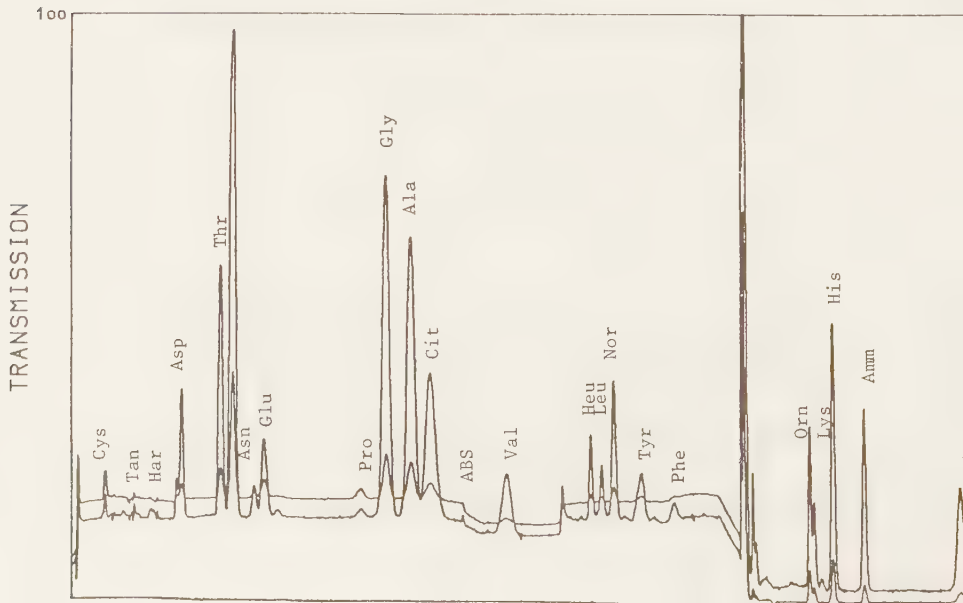
Die weitere Datenverarbeitung wurde auf einem Großrechner (TR 440, Telefunken) durchgeführt.

Dazu wurden die Lochstreifen, auf denen die Meßwerte vom Fernschreiber gestanzt wurden, auf Lochkarten übertragen. Dieser Arbeitsgang war erforderlich, weil von der Lochkarten-Eingabe-Station nur kurze Programmläufe gestattet waren. Man

könnte die Daten auch direkt auf einem Magnetband speichern, von wo sie zur weiteren rechnerischen Verwendung abgerufen werden könnten.

Zur weiteren Auswertung der Meßwerte wird ein mathematisches Programm benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fortran-Programm Chroma nach H. Pratzel (16) verwandt. Dies ist sehr gut geeignet, vor allem unvollständige chromatographische Trennungen auszuwerten, wie sie hier vorliegen (unvollständige chromatographische Trennungen bringen – wie ich schon in einem früheren Kapitel daraufhingewiesen habe – eine enorme Analysenzeiteinsparung). Das Fortran-Programm Chroma bestimmt die Parameter der Peaks, die durch den Kolorimeterdurchgang der einzelnen ninhydringefärbten Aminosäuren als Extinktions- bzw. Transmissionswerte entstehen mit Hilfe einer iterativen Anpassung an eine mathematische Funktion.

Abbildung 3-Aminosäuren-Chromatogramm der Hornhaut



Die mathematische Beschreibung der Chromatogrammpeaks

Das von Pratzel (16) angegebene Verfahren zur Auswertung von unvollständigen chromatographischen Trennungen ist parametrisch. Bei einem solchen parametrischen Auswertungsverfahren muß erst eine mathematische Funktion gefunden werden, die die Peaks des Chromatogramms hinreichend genau beschreibt.

Die Schiefe ist das wesentliche Kriterium der chromatographischen Peaks. Sie kommt durch zwei gegeneinander zeitlich verschobene Gauß-Verteilungen der Substanz mit unterschiedlicher Dispersion in der mobilen und in der stationären Phase zustande.

Nach Pratzel lassen sich diese chromatographischen Peaks hinreichend genau mit einer sogenannten Bi-Gauß-Verteilung beschreiben. Für die Bi-Gauß-Verteilung werden folgende Parameter benötigt:

1. die Dispersion der Anstiegsflanke
2. die Dispersion der Abstiegsflanke
3. die Peakhöhe
4. die Retentionszeit

Der erste Schritt im Ablauf des Computerprogramms ist folgender:

1. die Trennung der Peak- und Basislinienbereiche
2. die Transmissionswerte in Extinktionswerte umrechnen
3. die Bestimmung der Extinktionsnullwerte für die Peaks aus benachbarten Basislinienbereichen

Der zweite Arbeitsgang des Programms besteht in der Peakgruppenanalyse: Das Chromatogramm wird in einzelne Peakgruppen zerlegt und jede Peakgruppe wird für sich analysiert. Es wird bestimmt, wieviel Peaks jede Gruppe beinhaltet.

Der dritte Arbeitsgang besteht aus einem Iterationsvorgang: Es werden die experimentell gewonnenen Meßwerte zur Berechnung der Parameter der Peakfunktion einer Summenfunktion aus mehreren Bi-Gauß-Funktionen angepaßt. Dabei wird versucht, das Abweichungsquadrat zwischen berechneter und experimenteller Kurve zu minimieren. Dazu werden die Parameter in einem Iterationsprozeß bis zur optimalen Lösung gestellt. Diese wird durch eine vorgegebene Höchstabweichung bestimmt.

Durch diese rechnerischen Vorgänge wird erreicht, daß die Abweichung der berechneten Peakfläche zur experimentell gewonnenen fast immer kleiner als 0,5 % ist.

Durch diese bisherigen Rechnungen sind die Flächen der einzelnen Aminosäurepeaks bestimmt worden. Man könnte nun aus der Fläche des Peaks die Konzentration der betreffenden Aminosäure bestimmen. Dies erweist sich aber als nicht einfach, da das Ninhydrin nicht stöchiometrisch mit den Aminosäuren reagiert, d. h. jede Aminosäure reagiert mit Ninhydrin in einem spezifischen Mengenverhältnis. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf die Errechnung der absoluten Aminosäurenkonzentrationen verzichtet. Stattdessen sind hier vereinfachend die Peakflächenwerte der einzelnen Aminosäuren zur weiteren Auswertung herangezogen worden, und zwar wurde für jede Aminosäurenpeakfläche folgende Standardisierung vollzogen, wie sie G. Vlachos (33) in seiner Arbeit durchführt:

Fläche des Aminosäurepeaks X

Fläche des Peaks von Valin

Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Testpersonengruppen anhand der vor-
genannten Kriterien zu vergleichen, müssen statistische Ver-
fahren herangezogen werden.

Für die vorliegende Arbeit hat sich der t-Test als am geeig-
netsten erwiesen. Es werden Testpersonen, die sich in einem
bestimmten zu untersuchenden Merkmal gleichen, in eine Grup-
pe zusammengefaßt. Aus den errechneten Werten der einzelnen
Aminosäuren werden Mittelwert, Standardabweichung und Stan-
dardfehler gebildet. Die gleichen mathematischen Berechnun-
gen werden an jener Testpersonengruppe unternommen, die
sich gerade in dem nämlichen Merkmal von der vorherigen
Gruppe unterscheiden. Die beiden Gruppen werden anschlie-
ßend gegenübergestellt und es wird errechnet, inwieweit sich
die Gruppen in ihren statistischen Werten unterscheiden oder
ähneln, d.h. es wird die statistische Irrtumswahrscheinlich-
keit bestimmt, mit deren Hilfe angegeben werden kann, mit wel-
cher Wahrscheinlichkeit diese Gruppen in ihren Werten unter-
scheidbar sind. Kleine Irrtumswahrscheinlichkeit bedeutet in
unserem Falle, daß die verglichenen Werte bzw. Gruppen sich
besonders gut unterscheiden und damit eine große Wahrschein-
lichkeit besteht, daß es sich hier um einen signifikanten Unter-
schied handelt.

In der vorliegenden Arbeit werden 3 Gruppenmerkmale unter-
sucht, nämlich Geschlecht, Haarfarbe und Augenfarbe. Es wer-
den folgende Aminosäuren zur Untersuchung gebracht:

Asparagin, Threonin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure,
Alanin, Citrullin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin,
Ornithin, Lysin, Histidin und Arginin.

Es werden folgende Gruppen im t-Test gegenübergestellt:

Männlich	- weiblich;	blond	- dunkelhaarig;
grünäugig	- braunäugig;	braunäugig	- blauäugig;

1. Ergebnisse des t-Testes

"männlich - weiblich"

x = weiblich; y = männlich

Zahl der Testpersonen: weiblich 25; männlich 25

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Asp	1,7340	0,907	0,181	51 %
y		1,5886	0,614	0,123	
x	Thr	3,0716	1,481	0,296	44,8 %
y		2,8224	0,662	0,132	
x	Ser	13,2598	3,608	0,734	23,6 %
y		12,2213	2,282	0,456	
x	Asn	0,7677	0,936	0,187	93,3 %
y		0,7474	0,751	0,150	
x	Glu	1,1900	1,205	0,241	65,8 %
y		1,0715	0,554	0,111	
x	Ala	5,0453	1,924	0,385	39,7 %
y		4,6586	1,180	0,236	
x	Cit	3,4668	1,587	0,317	56,4 %
y		3,7159	1,441	0,288	
x	Gly	6,8276	2,062	0,412	37 %
y		6,3968	1,176	0,235	
x	Ile	2,6934	1,641	0,328	38,2 %
y		2,3514	1,038	0,208	

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Leu	2,0211	1,092	0,218	89,9 ‰
y		1,9836	0,981	0,196	
x	Tyr	2,3314	0,985	0,197	87,6 ‰
y		2,3772	1,077	0,215	
x	Phe	0,6571	0,406	0,081	44,2 ‰
x	Orn	7,1905	5,891	1,178	5,9 ‰
y		4,4142	4,040	0,808	
x	Lys	2,9380	1,481	0,296	36 ‰
y		6,0784	16,742	3,348	
x	His	7,5790	2,316	0,463	57,8 ‰
y		8,0079	3,041	0,608	
x	Arg	2,9846	2,031	0,406	45 ‰
y		3,6038	3,507	0,701	

Aminosäuren mit niedrigen Irrtumswahrscheinlichkeiten:

Ornithin 5,9 ‰

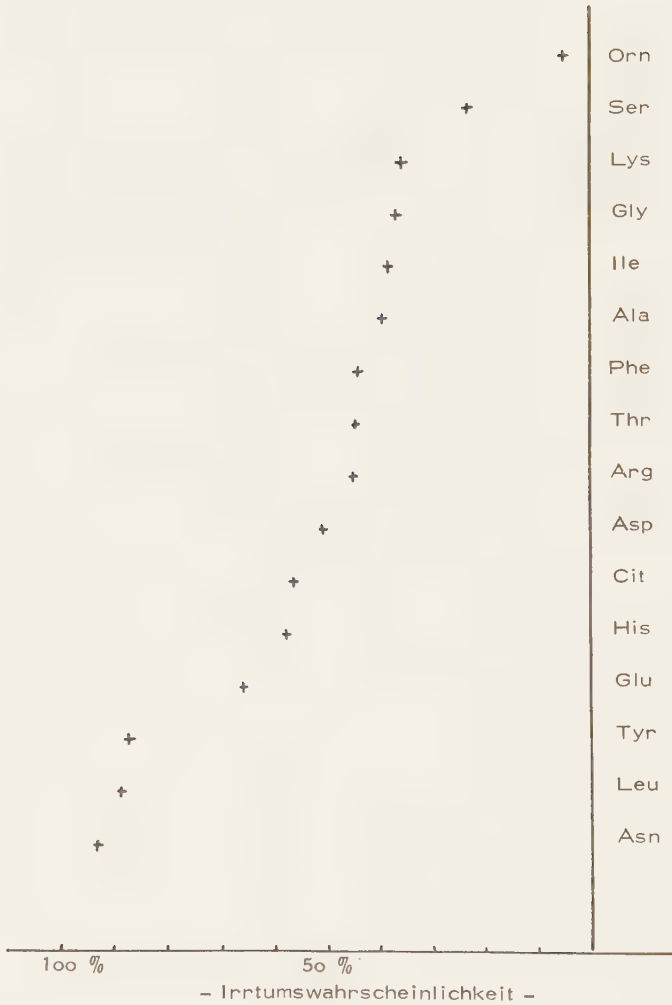


Abbildung 4: Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Gruppenzuordnung männlich-weiblich

2. Ergebnisse des t-Testes

"blond – dunkelhaarig"

x = dunkelhaarig; y = blond;

Zahl der Testpersonen: x = 31; y = 19

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Asp	1,6991	0,808	0,156	63,3 %
y		1,5997	0,591	0,136	
x	Thr	3,0393	1,382	0,243	40,5 %
y		2,7963	0,684	0,157	
x	Ser	12,8597	3,588	0,644	69,5 %
y		12,5462	2,028	0,465	
x	Asn	0,7020	0,871	0,156	55,5 %
y		0,8467	0,801	0,184	
x	Glu	1,2049	1,128	0,203	39,7 %
y		1,0098	0,457	0,105	
x	Gly	6,6397	1,923	0,345	87,1 %
y		6,5673	1,2174	0,279	
x	Ala	4,8341	1,843	0,331	91,1 %
y		4,881	1,112	0,255	
x	Cit	3,6167	1,722	0,309	86,8 %
y		3,5500	1,104	0,253	
x	Ile	2,3521	1,428	0,256	25,4 %
y		2,7998	1,256	0,288	

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Leu	1,9612	1,054	0,189	71,9 ‰
y		2,0695	1,007	0,231	
x	Tyr	2,2660	0,980	0,176	45,5 ‰
y		2,4984	1,098	0,252	
x	Phe	0,6517	0,40	0,079	28,5 ‰
y		0,7973	0,472	0,108	
x	Orn	5,5574	4,099	0,736	70,9 ‰
y		6,2021	6,717	1,541	
x	Lys	2,6370	1,332	0,239	27,6 ‰
y		7,5612	19,097	4,381	
x	His	7,3319	2,484	0,446	13,8 ‰
y		8,5465	2,892	0,663	
x	Arg	3,1462	2,944	0,529	64 ‰
y		3,5357	2,761	0,633	

Aminosäuren mit niederer Irrtumswahr-
scheinlichkeit:

Histidin 13,8 ‰

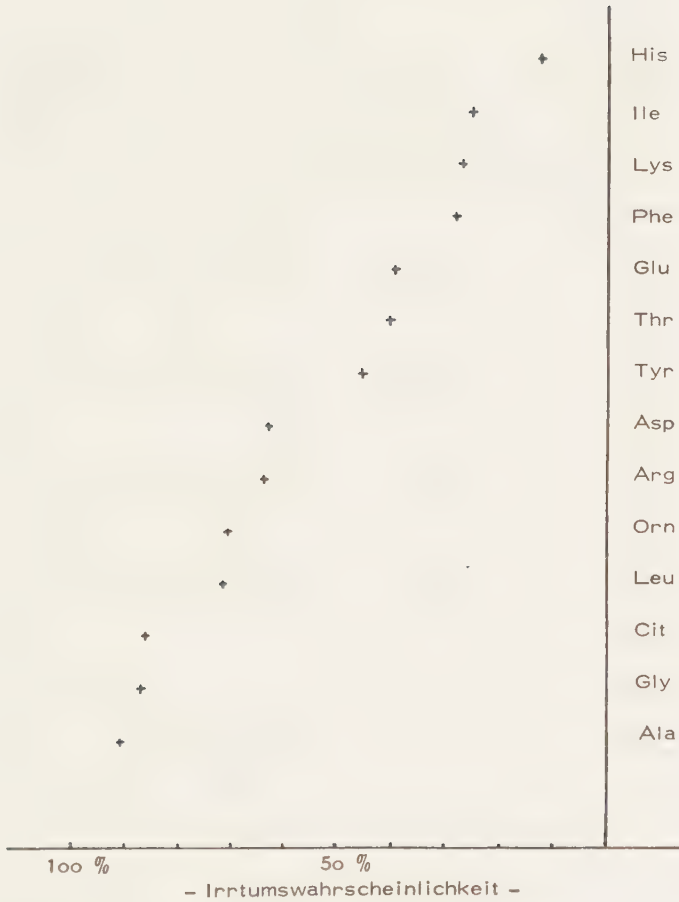


Abbildung 5: - Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Gruppenzuordnung blond-dunkelhaarig

3. Ergebnisse des t-Testes

"grünäugig – braunäugig"

x = braunäugig; y = grünäugig;

Zahl der Testpersonen: x = 17; y = 17

Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x Asp	1,8316	0,561	0,136	64,4 %
y	1,6921	1,092	0,265	
x Thr	3,0716	1,481	0,296	44,8 %
y	2,8224	0,662	0,132	
x Ser	13,2598	3,668	0,734	23,6 %
y	12,2213	2,292	0,456	
x Asn	0,9811	1,182	0,297	38,6 %
y	0,6895	0,677	0,164	
x Glu	1,4032	1,203	0,292	46,2 %
y	1,1255	0,955	0,232	
x Gly	6,5752	1,322	0,321	68,4 %
y	6,8559	2,480	0,602	
x Ala	4,5376	1,057	0,256	16,4 %
y	5,3022	1,925	0,467	
x Cit	3,6512	1,228	0,298	81,1 %
y	3,5050	2,167	0,526	
x Ile	2,5509	1,750	0,424	85,7 %
y	2,6465	1,286	0,312	

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Leu	2,0079	1,239	0,300	98,3 %
y		1,9996	1,045	0,253	
x	Tyr	2,2341	0,820	0,199	30,5 %
y		2,6263	1,309	0,318	
x	Phe	0,6335	0,495	0,120	22 %
y		0,8625	0,400	0,0097	
x	Orn	5,7900	4,170	1,011	55 %
y		7,0270	7,319	1,775	
x	Lys	2,7929	1,359	0,330	29,8 %
y		8,0696	20,187	4,896	
x	His	7,3275	2,660	0,645	16,5 %
y		8,5430	2,313	0,561	
x	Arg	2,6042	2,970	0,720	7,3 %
y		4,3702	2,570	0,623	

Aminosäuren mit niederen Irrtumswahrscheinlichkeiten:

Arginin 7,3 %

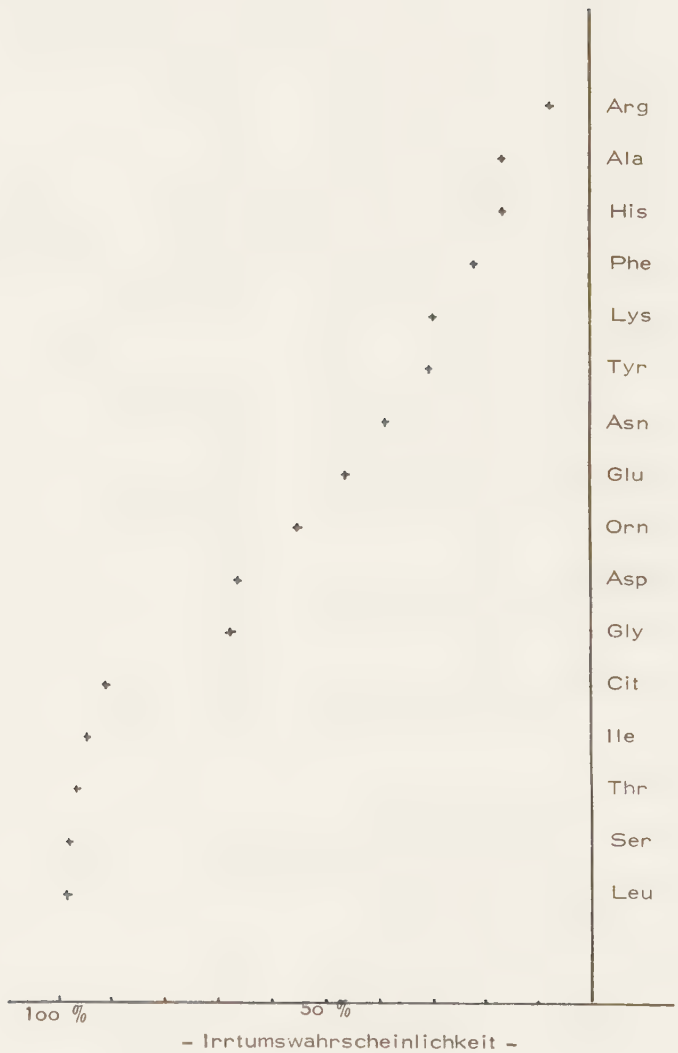


Abbildung 6: Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Gruppenzuordnung grünäugig-braunäugig

4. Ergebnisse des t-Testes

"braunäugig - blauäugig"

x = blauäugig; y = braunäugig

Zahl der Testpersonen: x = 16; y = 17

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x Asp		1,4477	0,494	0,124	4,5 %
y		1,8316	0,561	0,136	
x Thr		2,7513	0,318	0,079	31,5 %
y		3,0802	1,270	0,308	
x Ser		12,6635	1,765	0,441	85,1 %
y		12,7928	2,134	0,518	
x Asn		0,5924	0,483	0,121	22,5 %
y		0,9811	1,182	0,287	
x Glu		0,8468	0,372	0,093	8,5 %
y		1,4032	1,1203	0,292	
x Gly		6,3926	0,790	0,198	63,2 %
y		6,5752	1,322	0,321	
x Ala		4,7076	1,664	0,416	73,1 %
y		4,5376	1,057	0,256	
x Cit		3,6105	0,876	0,219	93,2 %
y		3,6512	1,228	0,298	
x Ile		2,3616	1,026	0,256	70,6 %
y		2,5509	1,750	0,424	

	Amino- säure	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler	Irrtumswahr- scheinlichkeit
x	Leu	1,9994	0,805	0,201	98,2 ‰
y		2,0079	1,239	0,300	
x	Tyr	2,1930	0,858	0,215	88,9 ‰
y		2,2341	0,820	0,199	
x	Phe	0,6582	0,464	0,116	88,3 ‰
y		0,6335	0,495	0,120	
x	Orn	4,5143	2,986	0,746	31,9 ‰
y		5,7900	4,170	1,011	
x	Lys	2,5466	1,324	0,331	60,2 ‰
y		2,7929	1,359	0,330	
x	His	7,4911	3,049	0,762	87,1 ‰
y		7,3275	2,650	0,645	
x	Arg	2,8841	2,849	0,712	78,4 ‰
y		2,6042	2,970	0,720	

Aminosäuren mit niederer Irrtumswahrscheinlichkeit:

Asparaginsäure 4,5 ‰

Glutaminsäure 8,5 ‰



Abbildung 7: - Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Gruppenzuordnung braunäugig-blauäugig

Zusammenfassung der Ergebnisse mit niedriger Irrtumswahrscheinlichkeit:

Gegenüberstellung der männlichen und weiblichen Individuen:

Ornithin 5,9 ‰

Gegenüberstellung der dunkelhaarigen und blonden Individuen:

Histidin 13,8 ‰

Gegenüberstellung der braunäugigen und grünäugigen Individuen:

Arginin 7,3 ‰

Gegenüberstellung der blauäugigen und braunäugigen Individuen:

Asparaginsäure 4,5 ‰

Glutaminsäure 8,5 ‰

Abkürzungen:

Ala = Alanin, Arg = Arginin, Asn = Asparagin, Cit = Citrullin,
Glu = Glutamin, Gly = Glycin, His = Histidin, Ile = Isoleucin,
Leu = Leucin, Lys = Lysin, Orn = Ornithin, Phe = Phenylalanin,
Ser = Serin, Thr = Threonin, Tyr = Tyrosin;

Diskussion

Um die vorliegenden Ergebnisse bewerten zu können, ist es vonnöten, sich die Herkunft der freien Aminosäuren wieder vor Augen zu führen.

Wie ich schon in einem früheren Kapitel beschrieben habe, ist die Mehrzahl der Autoren der Meinung, daß die freien Aminosäuren der Haut Produkte des Verhornungsprozesses sind. Diese Verhornungsprozesse werden wie alle anderen biologischen Vorgänge durch Enzyme katalysiert. Diese Enzyme steuern den Abbau der Zellorganellen in den verhornenden Zellen und den Aufbau des Keratins. Der Abbau der verschiedenen Zellstrukturen, die größtenteils aus Proteinen bestehen, führt über Peptide zu den freien Aminosäuren.

Wie auch im übrigen Körper findet man an der Haut zwei Hauptgruppen von proteolytischen Enzymen, und zwar Endopeptidasen und Exopeptidasen (Biochemie der Haut 1). In welchem Umfang die Proteine bei den Verhornungsprozessen zu freien Aminosäuren abgebaut werden, hängt von der Aktivität der Enzyme ab.

Es konnte gezeigt werden, daß im Bereich pathologisch veränderter Hautgebiete – wie bei Psoriasis und auch in Randgebieten von Hautkarzinomen – (Braun-Falco 3) erhöhte Aktivität von Proteasen vorhanden ist.

Die freien Aminosäuren der Hornhaut – als Produkte des Verhornungsprozesses – werden mit großer Wahrscheinlichkeit ähnlichen Um- und Abbauvorgängen unterworfen wie diejenigen in anderen Teilen des menschlichen Organismus. Dafür spricht vor allem die Tatsache, daß man in der Haut im großen und ganzen die gleichen Enzyme des Aminosäurestoffwechsels gefunden hat, wie sie auch im übrigen Körper vorhanden

sind, wenn auch die Enzyme der Haut in ihrer Aktivität zum Teil erheblich von derjenigen der Fermente in anderen Organen abweicht (Biochemie der Haut 1). Welche biochemische Wege des Aminosäurenstoffwechsels in der Haut bevorzugt ablaufen, hängt natürlich von der Aktivität der spezifischen Enzyme ab. Dabei können die quantitativen Verteilungen der Enzymsubstrate, in diesem Falle die Aminosäuren, Aufschluß über die Aktivität der jeweiligen Enzyme geben (J. P. Colombo 5).

In der vorliegenden Arbeit sind Unterschiede in den Konzentrationen bestimmter Aminosäuren bei dem Vergleich von verschiedenen Testpersonengruppen gefunden worden. Diese Unterschiede können auf der Verschiedenheit der Enzymaktivität bestimmter Fermente beruhen. Da sich die Testpersonengruppen durch genetisch festgelegte Merkmale, wie Augenfarbe, Haarfarbe und Geschlecht voneinander unterscheiden, liegt die Annahme nahe, daß die unterschiedliche Enzymaktivität – wie wir sie hier postulieren wollen – genetisch bedingt ist.

Wenn wir uns den hier vorliegenden Ergebnissen zuwenden, d. h. uns die Aminosäuren ansehen, die bei dem Vergleich der Testgruppen Unterschiede mit niedriger Irrtumswahrscheinlichkeit aufweisen, so fällt uns auf, daß alle (Ornithin, Arginin, Asparaginsäure und Glutaminsäure) mit Ausnahme von Histidin in direkter oder indirekter Weise mit dem Harnstoffzyklus in Verbindung stehen.

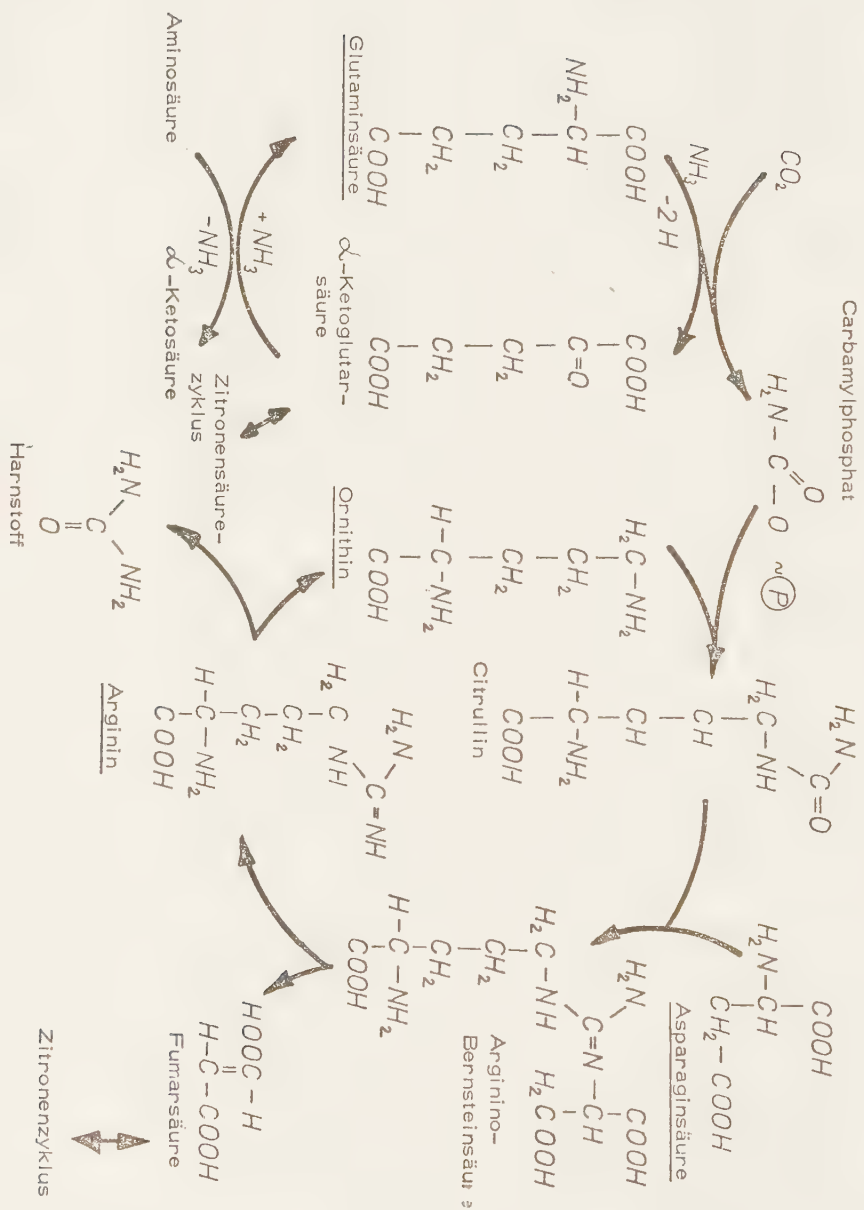
Die Funktion des Krebs-Henseleit-Zyklus ist die Ausscheidung des Aminosäuren- bzw. Proteinstickstoffes. Hierbei wird aus Kohlendioxid und Ammoniak Carbamylphosphat unter der Katalysatorwirkung von Carbamylphosphatsynthase gebildet. Das Carbamylphosphat lagert sich an Ornithin an

(Ornithincarbamyl-Transferase konnte allerdings in menschlicher Haut nicht nachgewiesen werden). Es entsteht Citrullin, welches mit Asparaginsäure unter Mitwirkung der Argininosuccinat-Synthetase Argininobernsteinsäure ergibt (auch diese Reaktion ist in der Haut noch nicht nachgewiesen worden). Die Argininobernsteinsäure wird durch die Arginino-Succinase in Arginin und Fumarat gespalten. Das Arginin wird schließlich durch die Arginase in Harnstoff und Ornithin zerlegt. (Siehe Abbildung 8 – nach Karlson 10)

Wie aus dem oben aufgeführten ersichtlich ist, sind die drei Aminosäuren Ornithin (Gegenüberstellung "männlich-weiblich"), Asparaginsäure (Gegenüberstellung "blauäugig-braunäugig") und Arginin (Gegenüberstellung "braunäugig-grünäugig") direkt am Harnstoffzyklus beteiligt, während die Glutaminsäure (Gegenüberstellung "blauäugig-braunäugig") nur indirekt mit dem Harnstoffzyklus in Verbindung steht.

Die Glutaminsäure könnte man als Ammoniaklieferant für den Harnstoffzyklus bezeichnen. Die wichtigste Reaktion, an der die Glutaminsäure beteiligt ist, ist die Transaminierung. Hier werden Aminogruppen von α -Aminosäuren auf die α -Keto-Glutarsäure übertragen, wobei Glutaminsäure entsteht. Enzymatisch wird diese Reaktion durch Transaminasen gesteuert. In der Säugetierhaut und auch in menschlicher Haut konnten die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase als auch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase nachgewiesen werden, wobei eine höhere Konzentration dieser Enzyme in der Haut als im Serum gefunden werden konnte (Hansen 8).

Wie bereits in einem früheren Kapitel besprochen wurde, wird ein Enzym des Harnstoffzyklus besonders hervorgehoben, nämlich die Arginase. Grüneberg (7) vertritt die Ansicht, daß diese bei dem im Laufe des Verhornungsprozesses auftretenden



Kernzerfall frei wird. Möglicherweise sind auch die anderen Enzyme des Harnstoffzyklus im Nukleus konzentriert und spielen im Kernstoffwechsel eine Rolle.

Diese Annahme liegt insofern nahe, da die basischen Proteine der Zellkerne – Protamine und Histone – zu 80 % aus Arginin bestehen, das ja ein wesentliches Substrat des Harnstoffzyklus ist. Rothberg (18) hat in einer Arbeit festgestellt, daß die Arginase in gesunder menschlicher Haut nicht frei vorliegt, sondern an eine hochmolekulare Trägergruppe gebunden ist. Auch soll in normaler Epidermis ein Arginasehemmer vorhanden sein. Roberts und Fränkel (17) fanden heraus, daß der weitaus größte Teil der menschlichen Arginase sich in der Haut befindet.

Interessanterweise ist bei bestimmten pathologischen Veränderungen der Haut (insbesondere tumorartige Veränderungen – Rothberg und Mitarbeiter) die Arginaseaktivität deutlich erhöht. Vor allem Tumore des Stratum spinosum weisen einen besonders hohen Arginasegehalt auf. Man bezeichnet die Arginase auch als Leitenzym der Stachelzellenschicht (Biochemie der Haut).

Von den Autoren Rothenborg (34), Rothmann und Sullivan (35) wird die Arginase als wirksamer Faktor bei der Karzinogenese in Betracht gezogen.

Ornithin und Arginin sind Substrate des Enzyms Arginase. Ihre verschiedenen Konzentrationen in der Gegenüberstellung der Testgruppen können auf unterschiedliche Aktivität der Arginase im Vergleich der Gruppen hindeuten, so daß in unserem Falle weibliche Personen eine andere Arginaseaktivität als männliche, genauso bräunäugige eine andere Arginaseaktivität haben als grünäugige.

Wenn man bedenkt, daß – wie vorher schon abgehandelt wurde – die Arginase als Faktor bei der Karzinogenese angesehen wird, so sind wir hier möglicherweise einer genetischen Anlage zur Karzinomentstehung auf der Spur.

Daß es eine genetische Bereitschaft für Malignome der Haut gibt, haben Lane-Brown und Mitarbeiter (12) aufgezeigt, die in einer Population keltischer Abstammung eine wesentlich höhere Hautkrebsrate vorfanden als bei Personen z.B. italienischer Abstammung.

Wie bereits vorher darauf hingewiesen wird, ist Histidin (Gegenüberstellung "dunkelhaarig-blond") nicht in den Kreis der Aminosäuren einzureihen, die in dem Stoffwechsel des Harnstoffzyklus einen Platz haben.

Histidin – besonders ein Produkt des Histidins, nämlich die Urocaninsäure, spielt in der Haut eine besondere Rolle. Lichtstrahlen induzieren aus Histidin die cis- und die trans-Form der Urocaninsäure.

Dieser werden in der menschlichen Haut Lichtschutzwirkungen zugeschrieben (Biochemie der Haut 1), wobei viele Arbeiten dafür sprechen, daß Urocaninsäure eine zentrale Stellung in den photochemischen Reaktionen der Haut hat.

Die geringere Konzentration des Histidins in der Haut von dunkelhaarigen Personen gegenüber blonden könnte darauf hindeuten, daß bei den Dunkelhaarigen vermehrt Urocaninsäure aus Histidin entsteht. Dies könnte eine Ursache dafür sein, daß dunkelhaarige Menschen bzw. deren Haut weniger sonnenempfindlich ist als die der blonden, weil sie vermehrt durch den "Sonnenschutzfaktor" Urocaninsäure geschützt ist.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, bei einer gesunden Population (im Alter zwischen 20 und 30 Jahren – 50 Testpersonen) Unterschiede in der biochemischen Beschaffenheit der Haut – genauer gesagt: Unterschiede in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren in der Hornschicht der Haut – aufzuzeigen und diese Unterschiede zu genetisch festgelegten Merkmalen (Geschlecht, Augenfarbe und Haarfarbe) in Beziehung zu setzen.

Das Hautmaterial wurde mittels der Abrißmethode "strip method" auf der ulnaren Seite der Unterarminnenfläche gewonnen. Die freien Aminosäuren wurden mit Hilfe von 0,1 n HCL aus der Klebefolie herausgelöst. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte mit einem automatischen Aminosäureanalysator (CBR 2, Fa. Labotron). Die Meßdaten wurden mittels eines Fernschreibers (Teletype ASR 33) im ASCII-Code auf einen Lochstreifen festgehalten und in einen Großrechner (TR 440, Telefunken) eingegeben. Die mathematische Auswertung der Meßwerte erfolgte mit dem Fortran-Program Chroma.

Die Testpersonen wurden nach vorgenannten Kriterien in Gruppen geordnet und mit Hilfe des t-Testes wurden die Meßergebnisse der Gruppenpaare "männlich–weiblich", "blond–dunkelhaarig", "grünäugig–braunäugig", "blauäugig–braunäugig" rechnerisch gegenübergestellt. Dabei konnten signifikante Unterschiede bei folgenden Aminosäuren aufgezeigt werden:

Ornithin Gegenüberstellung männlich–weiblich;
 Irrtumswahrscheinlichkeit 5,9 %;
 Mittelwert bei der weiblichen Testgruppe um
 62,9 % größer als der bei der männlichen;

Histidin Gegenüberstellung blond–dunkelhaarig;
 Irrtumswahrscheinlichkeit 13,8 %;

Mittelwert bei der blonden Testgruppe um
16,5 % größer als bei der dunkelhaarigen;

Arginin

Gegenüberstellung braunäugig-grünäugig;

Irrtumswahrscheinlichkeit 7,3 %;

Mittelwert bei der grünäugigen Testgruppe um
67,8 % größer als der bei der braunäugigen;

Asparaginsäure

Gegenüberstellung blauäugig-braunäugig;

Irrtumswahrscheinlichkeit 4,5 %;

Mittelwert bei der braunäugigen Testgruppe um
26,5 % größer als bei der blauäugigen;

Glutaminsäure

Gegenüberstellung blauäugig-braunäugig;

Irrtumswahrscheinlichkeit 8,5 %;

Mittelwert bei der blauäugigen Testgruppe um
67,5 % größer als bei braunäugigen;

Die signifikanten Aminosäuren Ornithin, Arginin, Glutaminsäure und Asparaginsäure sind direkt oder indirekt Substrate des Harnstoffzyklus, in dem ein Enzym – die Arginase – besondere Beachtung findet, da sie wie man heute annimmt, ein Faktor bei der Karzinogenese der Haut sein kann.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Unterschiede in den Substratkonzentrationen des Harnstoffzyklus im Vergleich von Gruppen, die nach genetisch festgelegten Merkmalen zusammengestellt wurden, können auf eine unterschiedliche genetisch determinierte Enzymaktivität, insbesondere Arginase-Aktivität, hinweisen, was möglicherweise auf eine genetische Diathese des Hautkreb-
ses hindeutet.

Einem Produkt der signifikanten Aminosäure Histidin, nämlich der Urocaninsäure, wird eine wichtige Rolle im Lichtschutzsystem der Haut zugesprochen. In dem in dieser Arbeit aufgezeig-

ten unterschiedlichen Histidingehalt der Haut im Vergleich von dunkelhaarigen und blonden Testpersonen, wobei man unterschiedliche Quantitäten des Histidin-Urocaninsäure-Systems der beiden Testgruppen postulieren kann, könnte man eine Ursache dafür sehen, daß blonde Menschen häufig sonnenempfindlicher sind als dunkelhaarige.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Herrmann F., Ippen H.,
Schaefer H., Stüttgen G.
"Biochemie der Haut"
Georg Thieme Verlag, 93-94 (1973)
- 2 Blank, H.
"Further observations on factors which
influence the water content of the stratum
corneum"
m. J. invest. Derm. 21, 259-269 (1953)
- 3 Braun-Falco, O.
"Histochemische Aminopepidase-Darstel-
lung in normaler Haut, bei Psoriasis,
Dermatitis, Basaliom, spinocellulärem
Karzinom und Molluscum Sebaceum"
Derm. Wschr. 134, 1341 (1956 c)
- 4 Burckhardt, W. u. W.
Bäumle
"Die Beziehung der Säureempfindlichkeit
zur Alkaliempfindlichkeit der Haut"
Dermatologica (Basel) 102, 294-301 (1951)
- 5 Colombo, J.P.
"Congenital Disorders of the Urea-Cycle
and Ammonia Detoxication"
Monographs in Paediatrics Vol I, 56-78
Verlag S. Karger
- 6 Erprecht, R.
"Elektrometrische Messungen des pH der
Hautoberfläche bei Hautgesunden und Ekzem-
patienten mit besonderer Berücksichtigung
der Säureneutralisation."
Dermatologica (Basel) 111, 204-223 (1955)

- 7 Grüneberg, Th.
Szakall, A.
"Über den Gehalt an Schwefel und wasserlöslichen Bestandteilen in der verhornten Epidermis bei normaler und pathologischer Verhornung (Psoriasis)"
Arch. klin. exp. Derm. 201, 361 (1955)
- 8 Hansen, A.P.
"Determination of ^L glutamic oxalacetic transaminase"
Nord. Med. 61, 799 (1959)
- 9 Jakobi, O.
"Die Inhaltsstoffe des normalen Stratum corneum und Callus menschlicher Haut"
Arch. klin. exp. Derm. 230, 183-194 (1967)
- 10 Karlson, P.
"Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler"
7. Auflage 129-149 (1976)
Georg Thieme Verlag
- 11 Keining, E.
Braun-Falco, O.
"Dermatologie und Venerologie"
Lehrbuch für Studierende und Ärzte
2. Auflage 864-865
J. F. Lehmanns Verlag
- 12 Lane-Brown, M.M.
Melia, D.F.
"A Genetic Diathesis To Skin Cancer"
J. Invest. Derm. 61, 39-41 (1973)
- 13 Marchionini, A.
"Physikalisch-chemische Untersuchungen an menschlicher Haut"
Haut. Klin. Wschr. 6, 248-256 (1928)

- 14 Müller, W.
"Aminokonzentrationen in der Hornschicht und deren Beziehungen zu exogenen und endogenen Faktoren"
Diss., Uni München 1973
- 15 Newbold, P. C. H.
"The Skin in Genetically-controlled Metabolic Disorders"
J. Med. Gen. 10, 101
- 16 Pratzel, H.
"Parametrische Auswertung unvollständiger chromatographischer Trennungen mit dem Fortran-Programm Chroma nach einer Bi-Gauss-Approximation"
Z. Anal. Chem. 261, 369-378 (1972)
- 17 Roberts, E.
Frankel, S.
"Arginase Activity and nitrogen content in epidermal carcinogenesis in mice"
Cancer Res. 9, 231 (1949)
- 18 Rothberg, S.
Van Scott, E. J.
"Evaluation of arginase-activity in normal epidermal tissue and pathological stratum corneum"
J. invest. Derm. 31, 263 (1958)
- 19 Rothenborg, H. W.
"Serum LDH and argininosuccinic Aciduria in Alopecia areata and Alopecia diffusa "
Acta derm.-venereol. (Stockh.)
48, 215 (1968)
- 20 Rothmann, S.
"Physiology and Biochemistry of the Skin"
University of Chicago Press, Chicago 1954

- 21 Rothmann, S.
Sullivan, M.B. "Amino acids on the Normal Human Skin Surface"
J. Invest. Derm. 13, 319-321 (1949)
- 22 Salfeld, K. "Zur Frage des energieliefernden Stoffwechsels und des Aminosäure-Metabolismus und der alternden Haut"
II. Mitt.: Enzymatische Aktivität der Epidermis Erwachsener im höheren Alter in Abhängigkeit von der Lokalisation.
Arch. Klin. exp. Derm. 225, 93 (1963)
- 23 Schneider, W.
Schuleit, H. "Der Fettmantel der Haut und seine Bedeutung für seine Benetzung"
Arch. Derm. Syph. (Berl.) 193, 434-459 (1951)
- 24 Schwarz, E. "Wasserlösliches"
Referat Kongress der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 1966
Thema: Psoriasis vulgaris
Arch. klin. exp. Derm. 227, 191-202 (1966)
- 25 Schwarz, E. "Klinisch-chemische Analysen von menschlicher Hautoberfläche"
Z. klin. chem. Biochem. 5, 247-251 (1967)
- 26 Schwarz, E. "Freie Aminosäuren und zugehörige Substanzen in abschabbarer Hornschicht und unbeeinträchtigter Psoriatikerhaut"
Arch. klin. exp. Derm. 231, 311-317 (1968)

- 27 Schwarz, E. "Freie Aminosäuren und verwandte Verbindungen in der abschabbaren Hornschicht unbefallener Haut mikrobiellen Ekzematikern und Hautgesunden"
Arch. Derm. Forsch. 242, 87-96 (1971)
- 28 Schwarz, E. "Biochemische Stigmata der Hautoberfläche im Alter"
Z. klin. chem. klin. Biochem. 12Jg. 93-97 (1974)
- 29 Steigleder, G.K. "Das Vorkommen von Enzymen an der Hautoberfläche"
Fette, Seifen, Anstrichmittel 66, 691 (1964)
- 30 Spier, H.W.
Pascher, G. "Die wasserlöslichen Bestandteile der peripheren Hornschicht (Hautoberfläche)"
Quantitative Analyse - VI. Urocaninsäure
Arch.klin.exp.Derm. 209, 181-193 (1959)
- 31 Szakall, A. "Über die Eigenschaften, Herkunft und physiologischen Funktionen der die H-Ionen-konzentration bestimmenden Wirkstoffe in der verhornten Epidermis"
Arch.klin.exp.Derm. 201, 576 (1955)
- 32 Tabachnik, J. "The freeamino acids, ammonia, urea, and pyrrolidone acid content of conventional and germ free albino guinea pig epidermis"
J. Invest. Derm. 54, No. 1 (1970)

- 33 Vlachos, G. "Zur Verteilung der freien Aminosäuren in menschlichen Hornschicht"
Diss. Uni München (1970)
- 34 Wallraff, J. "Leitfaden der Histologie des Menschen"
7. Auflage, 31-35 (1967)
Verlag Urban & Schwarzenberg

Herrn Prof. Dr. H. Drexel danke ich für die Übernahme des Referates.

Herrn Diplom-Chemiker Dr. H. Pratzel danke ich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 19.12.49 wurde ich als Sohn des Buchhalters Josef Maister und seiner Gattin Helene, geb. Müller, in Breslau geboren. 1951 flüchteten wir in die BRD und ließen uns in München nieder.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich in München die Volksschule an der Wilhelmstraße, danach kam ich in das Gisela-Gymnasium (1960-1969), wo ich auch das Abitur bestand.

Im Wintersemester 69/70 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität. 1970 legte ich mein Vorphysikum ab, 1972 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.

Im Juni 75 beendete ich erfolgreich das Examen in Humanmedizin. Danach arbeitete ich als Medizinalassistent. Meine Approbation als Arzt bekam ich im Januar 77. Im gleichen Monat begann ich als chirurgischer Assistenzarzt zu arbeiten.

